



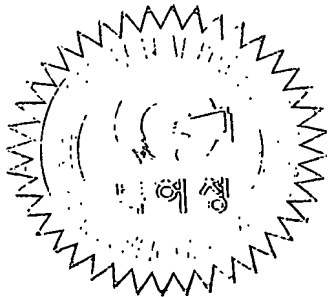
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0037060
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 06월 10일
Date of Application JUN 10, 2003

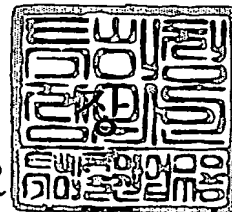
출원 인 : 주식회사 엘지생명과학
Applicant(s) LG Life Sciences Ltd.



2004 년 06 월 07 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.10
【발명의 명칭】	혈청 알부민을 함유하지 않는 안정한 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형
【발명의 영문명칭】	STABLE, AQUEOUS SOLUTION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN, NOT CONTAINING SERUM ALBUMIN
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엘지생명과학
【출원인코드】	1-2002-030835-0
【대리인】	
【성명】	손창규
【대리인코드】	9-1998-000300-9
【포괄위임등록번호】	2002-087038-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권규찬
【성명의 영문표기】	KWON, Kyu Chan
【주민등록번호】	700731-1057718
【우편번호】	136-110
【주소】	서울특별시 성북구 길음동 1279번지 래미안 길음1차 APT 103-103
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최속영
【성명의 영문표기】	CHOI, Suk Young
【주민등록번호】	740128-2654910
【우편번호】	305-752
【주소】	대전광역시 유성구 송강동 청솔 APT 103-612
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김명진
【성명의 영문표기】	KIM, Myung Jin

【주민등록번호】	590110-1064013
【우편번호】	305-803
【주소】	대전광역시 유성구 송강동 200-4번지 한마을 APT 114-1001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이승주
【성명의 영문표기】	LEE, Seung Joo
【주민등록번호】	630608-1018114
【우편번호】	302-756
【주소】	대전광역시 서구 갈마2동 큰마을 APT 126-1201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강영철
【성명의 영문표기】	KANG, Young Cheol
【주민등록번호】	640927-1953811
【우편번호】	306-778
【주소】	대전광역시 대덕구 송촌동 선비마을 APT 404-202
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오진석
【성명의 영문표기】	OH, Jin Seok
【주민등록번호】	730131-1162620
【우편번호】	441-340
【주소】	경기도 수원시 권선구 구운동 선경 APT 3-107
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김지언
【성명의 영문표기】	KIM, Ji Eon
【주민등록번호】	740523-2930817
【우편번호】	611-760
【주소】	부산광역시 연제구 연산1동 한성기린 APT 101-1107
【국적】	KR
【심사청구】	청구

출력 일자: 2004/6/18

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
손창규 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

1 면 1,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

10 항 429,000 원

【합계】

459,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 혈청 알부민을 사용하지 않으면서 에리쓰로포이에틴이 안정하게 장기간 그 활성을 유지하게 할 수 있는 안정한 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형에 관한 것으로, 약리학적 유효량의 인 에리쓰로포이에틴(human erythropoietin)과, 안정화제로서 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산과 수용성 무기염, 등장화제, 및 완충용액을 포함하는 것으로 구성되어 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

혈청 알부민을 함유하지 않는 안정한 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형 {STABLE, AQUEOUS SOLUTION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN, NOT CONTAINING SERUM ALBUMIN}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 혈청 알부민을 사용하지 않으면서 에리쓰로포이에틴이 장기간 그 활성을 유지하게 할 수 있는 안정한 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 약리학적 유효량의 인 에리쓰로포이에틴과, 안정화제로서 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산과 수용성 무기염, 등장화제, 및 완충용액을 포함하는 것으로 구성되어 있는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형을 제공한다.
- <2> 에리쓰로포이에틴은 골수에서 적혈구 모세포의 분화를 촉진하여 적혈구를 생성하는 당단백질로 165 개의 아미노산으로 이루어져 있다. 1977년 Mijake가 빈혈환자의 오줌으로부터 에리쓰로포이에틴을 정제한 이후로 유전자 조작을 통해 에리쓰로포이에틴의 대량 생산이 가능하게 되었다. 에리쓰로포이에틴은 만성 신부전증에 의한 빈혈과 다양한 원인에 의한 각종 빈혈의 치료 및 그 외에 외과 수술 보조 등 각종 조혈 작용에 탁월한 효과가 있음이 밝혀졌다 (Mijake et al., *J.Biol.Chem.*25, 5558-5564, 1977, Eschbach et al., *New Engl. J. Med.* 316, 73-78, 1987, Sanford.B.K, *Blood*, 177, 419-434, 1991, WO 85-02610). 이와 같은 효과로 인하여, 에리쓰로포이에틴은 여러 적응증에 대한 의약품으로서 오랜 기간 사용이 되어 왔다. 그러나, 다

른 단백질 의약품과 마찬가지로 에리쓰로포이에틴 역시 효율적인 사용을 위하여 안정성 소실에 의한 변성이 일어나지 않도록 여러가지 노력을 기울여야만 한다.

<3> 일반적으로, 단백질은 그 반감기가 무척 짧으며 적당하지 않은 온도, 물-공기의 계면에서의 노출, 고압, 물리적/기계적 스트레스, 유기용매, 미생물에 의한 오염 등에 노출시, 단량체의 응집, 응집에 의한 침전, 용기 표면에서의 흡착 등의 변성 현상을 나타낸다. 변성된 단백질은 원래의 물리화학적 성질 및 생리활성 효과를 소실하게 되는데, 이러한 단백질의 변성 현상은 비가역적이기 때문에, 한 번 변성된 단백질은 원래의 특성을 거의 회복할 수 없다. 특히, 에리쓰로포이에틴과 같이 1 회에 수백 마이크로그램 이하의 미량으로 투여되는 단백질의 경우, 그 안정성이 소실되어 용기내 표면 흡착시 그 손실이 상대적으로 더 크다는 문제점이 있다. 또한, 흡착된 단백질은 변성 과정에 의하여 쉽게 응집되며, 이렇게 응집된 변성 단백질은 인체에 투여시, 인체내에서 자연적으로 생산되는 단백질 자체에 대하여 항체 형성의 원인으로 작용하게 되므로, 단백질이 충분히 안정한 상태가 되도록 투여하여야 한다. 따라서, 용액중의 단백질의 변성을 막기 위하여 여러가지의 방법들이 연구되어 왔다 (John Geigert, *J.Parenteral Sci. Tech.*, 43, No5, 220-224, 1989, David Wong, *Pharm.Tech.* october, 34-48, 1997, Wei Wang., *Int.J.Pharm.*, 185, 129-188, 1999, Willem Norde, *Adv.Colloid Interface Sci.*, 25, 267-340, 1986, Michelle et al., *Int.J.Pharm.* 120, 179-188, 1995).

<4> 일부 단백질 약품은 동결 건조방법으로 안정성 문제를 해결하고 있다. 그러나, 동결 건조 제품은 사용할 때, 다시 주사용수에 녹여야 하는 불편이 있고, 동결 건조과정이 생산 공정에 포함되어 있어서, 대용량의 동결 건조기를 사용해야만 하는 등 대규모의 투자가 필요하다. 분무 건조기를 사용하여 단백질을 분말화하는 방법도 사용되고 있는데, 이 경우 낮은 수율로 인하

여 경제성이 떨어지는 단점이 있고, 고온에 노출되기 때문에 단백질 자체의 안정성에 부작용을 미칠 수도 있다.

- <5> 이상과 같은 방법들의 한계를 해결하는 대안으로서, 용액 상태인 단백질에 안정화제를 첨가하여 단백질의 안정성을 향상시키는 방법이 있다. 단백질의 안정화제로는 계면활성제, 혈청 알부민, 다당류, 아미노산, 고분자, 염류 등이 알려져 있다 (John Geigert, *J.Parenteral Sci. Tech.*, 43, No5, 220-224, 1989, David Wong, *Pharm.Tech.*, october, 34-48, 1997, Wei Wang., *Int.J.Pharm.*, 185, 129-188, 1999). 그러나, 각각의 단백질의 물리화학적 특성에 따라 그 단백질에 가장 적절한 안정화제를 사용해야만 하며, 안정화제들을 병용할 경우 상호간의 경쟁작용 및 부작용으로 인하여 목적인 바와 다른 역효과를 가져올 수 있고, 또한 단백질을 안정화하는데 적합한 범위의 농도가 존재하므로, 용액중의 단백질을 안정화하기 위해서는 많은 노력과 주의가 필요하다 (Wei Wang., *Int.J.Pharm.* 185, 129-188, 1999).
- <6> 단백질의 안정화제들 중 인 혈청 알부민과 젤라틴과 같은 인간 또는 동물 유래의 물질은 단백질 수용액제형의 안정화제로 널리 사용되고 있으며, 그 효과가 탁월하다. 그러나, 인 혈청 알부민은 인체의 혈액으로부터 제조되므로, 인간 유래의 병원성 바이러스에 의한 오염 가능성이 존재하며, 젤라틴이나 우 혈청 알부민은 Transmissible Spongiform Encephalopathies 와 같은 질환의 원인으로 작용하거나, 또는 일부 환자의 경우에는 알레르기 반응을 유발할 가능성도 있으므로, 유럽 각국에서는 인간 및 동물 유래의 물질을 의약품의 첨가물로 사용하는 것을 제한하고 있는 추세이다 (EMEA/CPMP/BWP/450/01 Report from the Expert Workshop on Human TSEs and Medicinal products derived from Human Blood and Plasma (1 December 2000), CPMP/PS/201/98 Position Statement on New Variant CJD and Plasma-Derived Medicinal Products (Superseded by CPMP/BWP/2879/02)). 이에 따라, 기존의 혈청 알부민을 포함하는 에

리쓰로포이에틴 제형을 개선하여, 인간 또는 동물 유래의 물질인 혈청 알부민을 함유하지 않고도 안정한 제형을 개발할 수 있는 방법이 필요하다.

- <7> USP 4879272에서는 에리쓰로포이에틴의 용기내 표면 흡착 방지제로 인/우 혈청 알부민, 레시틴, 텍스트란, 셀룰로스 등을 첨가하였다. 상기 미국특허에 따르면, 20℃에서 2 시간 보관 후, 에리쓰로포이에틴의 회수율이 69 ~ 98%로 부형제 무첨가군의 회수율인 16% 보다 좋지만, 에리쓰로포이에틴 자체의 전체 손실량이 너무 크다는 문제점이 있다.
- <8> USP 4806524에서는 에리쓰로포이에틴의 안정화제로 폴리에틸렌 글리콜, 단백질, 당류, 아미노산, 유기염, 무기염 등을 사용한 동결건조 제형과 용액 제형을 기술하고 있다. 상기 미국특허에 따르면, 25℃에서 일주일 보관시, 동결 건조 제형이 87 ~ 98%의 비교적 높은 회수율을 보이지만, 용액 제형의 경우 60 ~ 70% 대의 낮은 회수율을 나타내므로, 비교적 안정하지 못하다는 문제점을 가지고 있다.
- <9> USP 4992419 에서는 흡착방지제로 0.5 ~ 5 g/l 의 비이온 계면활성제, 안정화제로 5 ~ 50 g/l 의 요소, 5 ~ 25 g/l 의 아미노산 등을 사용한 에리쓰로포이에틴의 액상 및 동결 건조 제형에 대해 기술하고 있다. 그러나, 상기 미국특허에 따른 용액 제형은 인 혈청 알부민을 포함한 제형과 비교할 때 낮은 안정성을 보였으며, 동결건조 제형은 재용해 과정을 거쳐야 하는 단점이 있으므로, 바람직하지 못하다.
- <10> USP 5376632에서는 β 혹은 γ 사이클로텍스트린을 함유하되 다른 일반적인 의약품의 부형제를 포함하지 않는 에리쓰로포이에틴의 용액 제형, 동결건조 제형 및 분무건조 분말 제형을 기술하고 있다. 그러나, 상기 미국특허에서의 사이클로텍스트린 계열 물질은 신장에 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 현실적이지 못한 제형이다.

- <11> USP 5661125에서는 방부제로서 벤질알콜(benzyl alcohol), 파라벤(parabens), 페놀 및 그의 혼합물을 포함한 제형을 기술하고 있으며, 인 혈청 알부민을 포함한 에리쓰로포이에틴 제형과 비교 안정성 시험 결과를 나타내었다. 그러나, 상기 미국특허의 제형은 시험 결과 저온에서도 침전물이 나타나는 등의 낮은 안정성 결과를 나타내었다.
- <12> WO 01/87329 A1에서는 다가 무기 음이온이 함유된 완충용액의 pH를 5.5 내지 7.0으로 유지하는 에리쓰로포이에틴 용액 제형을 기술하고 있다. 상기 출원에서는 비교 안정성 시험에서 에리쓰로포이에틴과 PEGylated 에리쓰로포이에틴을 6 개월간 여러 온도에서 보관한 다음 Sialic acid의 함량 및 표준 물질 대비 생체활성도(%)를 측정하여 용액 제형의 안정성을 평가하고 있으나, 에리쓰로포이에틴의 단량체의 함량은 측정하지 않아서 제형의 안정성 평가 기준 중 에리쓰로포이에틴의 단량체 회수율(%)를 정확히 판정할 수는 없다.
- <13> 그러므로, 알부민과 같은 동물 유래의 단백질 성분을 사용하지 않으면서 에리쓰로포이에틴이 장기간 생체내 활성을 안정하게 유지하게 할 수 있는 새로운 용액 제형에 대한 개발의 필요성이 커지고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <14> 본 발명의 목적은 인간 또는 동물 유래의 혈청 알부민을 사용하지 않고도 장기간 생체내 활성 유지가 가능한 안정한 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형을 제공하는 것이다.
- <15> 본 발명자들은 수많은 실험과 심도있는 연구를 거듭한 끝에, 약리학적 유효량의 인 에리쓰로포이에틴을 특정한 성분의 안정화제들, 등장화제 및 완충용액과 혼합하면, 용액상태에서 에리쓰로포이에틴 단백질을 장기간 보관시 발생하는 변성과 용기에의 흡착 등을 방지할 수 있는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형이 만들어짐을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

【발명의 구성】

- <16> 따라서, 본 발명은, 약리학적 유효량의 인 에리트로포이에틴(human erythropoietin)과, 안정화제로서 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산과 수용성 무기염, 등장화제, 및 완충용액을 포함하는 것으로 구성되어 있는 인 에리트로포이에틴 용액 제형을 제공한다.
- <17> 본 발명의 용액 제형에서, 상기 인 에리트로포이에틴은 천연 및 유전자 재조합 방법에 의해 동물세포에서 발현시켜 분리 정제하여 사용할 수 있으므로, 본 발명에 사용될 수 있는 인 에리트로포이에틴은 모든 종류의 에리트로포이에틴을 포함한다.
- <18> 본 발명의 용액 제형은 상기 에리트로포이에틴을 안정화하여 용기 표면에 에리트로포이에틴이 흡착하는 것을 방지하기 위하여 비이온 계면활성제를 포함하고 있는 바, 상기 비이온 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 소수성 표면에 단백질이 흡착하거나 응집되는 것을 방지하여 준다. 본 발명에 사용될 수 있는 비이온 계면활성제의 바람직한 예로는 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제와 플록사머계 비이он 계면활성제 등을 들 수 있지만, 이들 만으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있으며, 그 중에서도 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제가 더욱 바람직하다. 그러한 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제의 예로는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60, 폴리솔베이트 80 등이 있으며, 그 중에서도 폴리솔베이트 20이 특히 바람직하다. 상기 폴리솔베이트 20은 임계 미셀 농도(Critical Micelle Concentration: CMC)가 상대적으로 낮기 때문에 낮은 농도에서도 단백질의 표면 흡착을 줄이거나 방지하는 효과가 있을 뿐만 아니라, 단백질의 화학적 분해(chemical degradation)를 억제한다. 상기 비이온 계면활성제를 용액 제형에 고농도로 사용하는 것은 적절하지 못한데, 고농도의 비이온 계면활성제는 UV-spectroscopy나 Isoelectrical Focusing 같은 분석법으로 단백질의 농도 측정이나 안정성을 평가할 때에 간섭효과를

유발하여, 단백질의 안정성을 정확하게 평가하기가 어렵기 때문이다. 또한, 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제의 하나인 폴리솔베이트 80을 Rat에 50000 ppm 이상 15 개월간 경구 투여시, 체중이 감소하는 부작용이 보고되어 있기 때문에(Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 1992 Jan:415:1-225), 이를 고농도로 제형에 적용할 때에는 그 제형의 안전성이 의문시 될 수 있기 때문이다. 따라서, 본 발명의 용액 제형에는 상기 비이온 계면활성제가 바람직하게는 0.01%(w/v) 이하의 저농도, 더욱 바람직하게는, 0.0001 내지 0.01%(w/v)로 포함된다.

<19> 아미노산은 용액 상태에서 에리쓰로포이에틴 주위에 더 많은 물 분자가 존재하도록 하여 에리쓰로포이에틴을 구성하는 아미노산들 중 최외곽에 존재하는 친수성 아미노산을 더욱 안정화시켜 에리쓰로포이에틴이 안정화되도록 하는 효과가 있다 (Wang, Int. J. Pharm. 185 (1999) 129-188). 전하를 가진 아미노산은 에리쓰로포이에틴과의 정전기적 결합으로 인해 에리쓰로포이에틴의 응집을 촉진할 수 있으므로, 본 발명의 용액 제형에서는 중성 아미노산을 사용한다. 본 발명에 사용될 수 있는 중성 아미노산의 바람직한 예로는 글리신, 알라닌, 류신, 이소류신 등을 들 수 있지만, 이들 만으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합으로 사용될 수 있다. 그 중에서도, 특히 글리신이 바람직하다. 본 발명의 용액 제형에서 중성 아미노산의 사용량은 0.001 내지 2%(w/v)인 것이 바람직하며, 사용량이 너무 적으면 더욱 상승된 안정화 효과가 나타나지 않는 문제점이 있을 수 있고, 반대로 사용량이 너무 많으면 제형의 삼투압이 너무 높아지거나 에리쓰로포이에틴의 용해도에 영향을 미쳐서 고농도의 제형을 제조할 수 없는 문제점이 있을 수 있다.

<20> 본 발명의 용액 제형에서 에리쓰로포이에틴을 액상에서 안정화하기 위한 안정화제들 중의 하나로서 사용되고 있는 상기 다가 알코올의 바람직한 예로는, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 저분자량의 폴리에틸렌글리콜, 저분자량의 폴리프로필렌글리콜 등을 들 수 있지만, 이들 만으

로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있다. 그 중에서도 특히 프로필렌 글리콜이 바람직하다. 프로필렌글리콜은 소수성 물질의 용매, 추출제(extractant), 그리고 방부제 및 보존제로서 장관(parenteral) 또는 비장관(non-parenteral) 경로로 투여되는 의약품에 광범위하게 사용되어 왔으며, 독성이 없는 물질로 평가된다. 또한, 식품 및 화장품에 emulsifier 및 vehicle로 사용되기도 한다. 상기 다가 알코올의 사용량은 바람직하게는 0.0001 내지 0.1%(w/v)이며, 사용량이 너무 적으면 더욱 상승된 안정화 효과가 나타나지 않는 문제점이 있을 수 있고, 반대로 사용량이 너무 많으면 제형의 삼투압이 너무 높아지거나 제형의 안전성에 문제점이 있을 수 있다.

- <21> 상기 수용성 무기염은 상기 중성 아미노산과 유사한 작용기작으로 에리쓰로포이에틴을 용액상에서 더욱 안정화시키는데 기여하며, 본 발명의 용액 제형에 사용될 수 있는 수용성 무기염의 바람직한 예로는, 염화나트륨, 염화칼슘, 황산나트륨 등을 들 수 있지만, 이들 만으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있다. 그 중에서도, 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 무기염은 염화나트륨이다. 상기 수용성 무기염의 사용량은 바람직하게는 0.001 내지 0.7%(w/v)이며, 사용량이 너무 적으면 더욱 상승된 안정화 효과가 나타나지 않는 문제점이 있을 수 있고, 반대로 사용량이 너무 많으면 제형의 삼투압이 너무 높아지는 문제점이 있을 수 있다.
- <22> 본 발명에 따른 용액 제형에 포함되는 상기 안정화제들의 조합은 상호 경쟁작용을 일으키지 않고 상호 보완작용으로 에리쓰로포이에틴을 용액상에서 더욱 안정화시킨다. 본 발명자들의 연구에 따르면, 예를 들어, 프로필렌글리콜이 단독으로도 에리쓰로포이에틴을 수용액상에서 어느 정도 안정하게 유지시켜 주는 효과를 나타낼 수 있지만, 상기 중성 아미노산과 함께 사용할 때 보다 향상된 안정화 효과를 나타낼 수 있음이 확인되었다. 또한, 다른 예로서, 중성 아미

노산을 프로필렌글리콜을 제외한 다른 안정화제들과 함께 사용하는 경우보다, 프로필렌글리콜을 포함하여 사용하는 경우에 에리쓰로포이에틴을 더욱 안정화시킬 수 있음이 확인되었다. 따라서, 상기 설명한 안정화제들 중에 어느 한 종류의 물질이라도 제형에 첨가하지 않는 경우에는, 현저히 저하된 에리쓰로포이에틴의 안정성을 보인다. 이러한 사실들은 추후 설명하는 실시예들과 비교예들에서 실험적으로 입증된다.

<23> 본 발명의 용액 제형에서 상기 등장화제는 제형의 삼투압을 주사하기에 적합하도록 조절하는 역할을 하는 바, 그러한 등장화제의 바람직한 예로는 만니톨, 솔비톨, 시클리톨, 이노시톨 등을 들 수 있지만, 이들 만으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합으로 사용될 수 있다. 그 중에서도 만니톨이 특히 바람직하다. 등장화제의 사용량은 제형에 포함된 성분들의 종류, 량 등에 따라 각각의 혼합물이 등장액이 되도록 적절한 함량으로 조절될 수 있으며, 만니톨의 경우, 바람직하게는 0.1 내지 1.0%(w/v)로 포함된다.

<24> 본 발명의 용액 제형에서 상기 완충용액은 에리쓰로포이에틴이 안정해지도록 용액 제형의 pH가 급격히 변화하지 않게 용액의 pH를 유지시키는 역할을 하는 바, 그러한 완충용액의 바람직한 예로는 인산 완충용액(Phosphate buffer), 구연산 완충용액(Citrate buffer), 트리스 완충용액(Tris buffer) 등을 들 수 있지만, 이들 만으로 한정되는 것은 아니다. 그 중에서도 인산 완충용액이 특히 바람직하다. 예를 들어, 인산 완충용액을 구성하는 인산염의 농도는 바람직하게는 5 mM 내지 50 mM 이고, pH는 바람직하게는 6.0 내지 8.0, 더욱 바람직하게는 6.5 내지 7.5이다.

<25> 본 발명의 용액 제형에는 상기 설명한 안정화제들, 등장화제, 완충용액 이외에, 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수도 있다.

- <26> 이하 실시예에서 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 예시일 뿐이므로, 하기의 실시예에 의하여 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- <27> 실시예 1 : 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조
- <28> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20, 0.1%의 프로필렌글리콜, 1.5%의 글리신, 및 0.1%의 염화나트륨을 넣고 에리쓰로포이에틴((주)LG생명과학)을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣은 후 1.0%의 만니톨을 넣어 등장액이 되도록 조절하였다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한 다음 밀봉하여 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <29> 비교예 1 : 무첨가제 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조
- <30> 10 mM 인산염 용액에 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣었다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한 다음 밀봉하여, 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <31> 비교예 2 : 폴리솔베이트 20만이 함유된 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조
- <32> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20을 넣고 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣었다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한 다음 밀봉하여, 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <33> 비교예 3 : 프로필렌글리콜이 포함되지 않은 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조

- <34> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20, 1.5%의 글리신, 및 0.1%의 염화나트륨을 넣고, 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣은 후, 만니톨을 넣어 등장액이 되도록 조절하였다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한, 다음 밀봉하여, 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <35> 비교예 4 : 글리신이 포함되지 않은 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조
- <36> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20, 0.5%의 프로필렌글리콜, 및 0.1%의 염화나트륨을 넣고, 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣은 후, 만니톨을 넣어 등장액이 되도록 조절하였다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한 다음 밀봉하여, 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <37> 비교예 5 : 염화나트륨이 포함되지 않은 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형의 제조
- <38> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20과 0.5%의 프로필렌글리콜을 넣고, 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml 가 되도록 넣은 후, 만니톨을 넣어 등장액이 되도록 조절하였다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리 바이알에 2 ml 씩 분주한 다음 밀봉하여, 25℃와 37℃에서 보존하였다.
- <39> 위의 실시예 1과 비교예 1 내지 5를 0 주, 3 주 및 5 주 시점에서 각각 SEC-HPLC를 이용하여, 에리쓰로포이에틴의 단량체와 이중체의 비율을 측정하여, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

<40> 【표 1】

	회수율(%)				이중체(%)			
	25℃		37℃		25℃		37℃	
	3 주	5 주	3 주	5 주	3 주	5 주	3 주	5 주
실시예 1	100	98.9	94.2	93.5	0.0	0.0	0.0	0.0
비교예 1	87.1	86.5	78.6	75.6	0.0	0.0	0.0	0.0
비교예 2	91.1	92.4	83.4	82.6	0.0	0.0	11.0	13.1
비교예 3	93.4	93.0	85.5	83.7	0.0	0.0	7.2	9.8
비교예 4	94.1	93.5	87.2	85.1	0.0	0.0	4.3	6.5
비교예 5	95.2	94.8	90.2	88.3	0.0	0.0	1.35	2.4

- <41> 상기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 에리쓰로포이에틴 용액 제형인 실시예 1은, 37℃, 5 주 시점에서도 92% 이상의 우수한 회수율을 보였으며, 이중체는 검출되지 않았다. 반면에, 폴리솔베이트 20만이 첨가된 제형인 비교예 2는 무첨가 제형인 비교예 1 보다 회수율은 높았지만, 이중체가 검출되었다. 또한, 비교예 3 - 5를 보면, 본 발명에 따른 용액 제형에서 하나의 성분이라도 첨가되지 않은 경우에는 37℃, 3주 시점부터 이중체가 검출되었으며, 에리쓰로포이에틴의 회수율도 80% 대로 감소되었다. 프로필렌글리콜이 첨가되지 않은 비교예 3과 글리신이 첨가되지 않은 비교예 4의 제형은, 둘 다 포함된 비교예 5의 제형에 비하여, 이중체가 많이 생성되었으며, 낮은 회수율을 보였다. 상기 결과로부터 프로필렌글리콜과 글리신의 상승효과를 확인할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 에리쓰로포이에틴 용액 제형에 첨가된 흡착 방지제, 안정화제 및 등장화제들은 각각의 효과도 있지만, 상호간의 상승작용으로 인하여 용액내 에리쓰로포이에틴의 흡착방지 및 안정성을 향상시키는 것을 알 수 있다.
- <42> 이하에서는, 본 발명의 제형을 고농도의 에리쓰로포이에틴에 적용한 후, 장기간 보존하면서 본 발명의 제형의 안정성 평가를 실시하였다.

<43> 실시예 2 : 고농도 에리트로포이에틴 용액 제형의 안정성 실험

<44> 10 mM 인산염 용액에 0.003%의 폴리솔베이트 20, 0.1%의 프로필렌글리콜, 1.5%의 글리신, 및 0.1%의 염화나트륨을 넣고, 에리트로포이에틴을 농도가 12000 IU/ml 가 되도록 넣은 후, 만니톨을 넣어 등장액이 되도록 조절하였다. 제조한 용액을 1 ml 유리 pre-filled syringe (Becton-Dickinson)에 0.5 ml로 충전한 다음, 5, 25℃ 및 40℃ 에서 각각 3 개월 이상 보관 후, 정해진 시간에 샘플링하여, SEC-HPLC 및 RP-HPLC로 회수율과 순도를 측정하였으며, B6D2F1 마우스에 투여하여 망상적혈구(reticulocyte)의 증가 정도를 측정함으로써 생리활성도를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

<45> **【표 2】**

	5℃ 저장			25℃ 저장			40℃ 저장		
저장기간(월)	0	6	12	2	4	6	1	2	3
회수율(%)	100.0	107.8	104.5	100.0	100.0	103.9	100.0	96.1	94.1
순도(%)	100.0	99.9	99.9	100.0	99.8	99.3	99.8	99.3	99.2
생리활성(%)	89.7	90.8	NT	90.4	90.8	93.8	105.3	82.8	91.8

<46> 상기 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 실시예 2의 고농도 에리트로포이에틴 용액 제형은 5℃ 에 저장하는 경우 12 개월까지 완전한 회수율, 순도 및 생리활성을 보였으며, 25℃에 저장하는 경우에도 6 개월까지 완전한 회수율, 순도 및 생리활성을 보였다. 또한, 고온인 40℃에 저장하는 경우에도 3 개월까지 94%에 달하는 회수율을 보였으며, 순도 및 생리활성 역시 약간의 감소만 나타내었다. 이로써, 실시예 2의 제형은 매우 안정한 제형임이 확인되었다.

<47> 실시예 3: pH에 따른 영향에 대한 시험

<48> 10 mM 인산 완충액에 0.003% 의 폴리솔베이트 20, 0.5%의 프로필렌글리콜, 1.5%의 글리신, 및 0.1%의 염화나트륨을 넣고, 에리쓰로포이에틴을 농도가 4000 IU/ml이 되도록 넣은 후, 아세트산과 수산화나트륨을 이용하여 각 pH를 조절하였다. 제조한 용액을 3 ml 용량의 유리용기에 2 ml 씩 넣어 밀봉하고, 40℃에서 3주간 보존 후, SEC-HPLC를 이용하여 에리쓰로포이에틴의 단량체와 이중체의 비율을 측정하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

<49> 【표 3】

PH	회수율 (%)	이중체 (%)
6.0	94.4	0.0
6.5	95.2	0.0
7.0	94.3	0.0
7.5	90.3	0.0
8.0	81.7	0.0
8.5	69.8	0.0
9.0	55.3	11.8

<50> 상기 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 제형의 pH가 6.0에서 7.5 사이인 경우에 40℃, 3 주 보존 후에도 90% 이상의 단량체 회수율을 보였다. 이로부터, 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산, 수용성 무기염, 등장화제 등을 함유한 본 발명에 따른 에리쓰로포이에틴 용액 제형은 pH 6.0 ~ 7.5에서 매우 안정함을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<51> 인 에리쓰로포이에틴과, 안정화제로서 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산과 수용성 무기염, 등장화제, 및 완충용액을 포함하고 있는 본 발명에 따른 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형은, 에리쓰로포이에틴 단백질을 용액상태에서 장기간 보관시 발생하는 변성으로 인하여

생리적 활성을 잃게 되는 문제점을 개선하고, 아울러 에리쓰로포이에틴 단백질이 용기에 흡착되는 것을 방지할 수 있는 효과를 가진다.

<52> 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

약리학적 유효량의 인 에리트로포이에틴(human erythropoietin)과, 안정화제로서 비이온 계면활성제, 다가 알코올, 중성 아미노산과 수용성 무기염, 등장화제, 및 완충용액을 포함하는 것으로 구성되어 있는 인 에리트로포이에틴 용액 제형.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 인 에리트로포이에틴은 천연 또는 유전자 재조합 에리트로포이에틴인 것을 특징으로 하는 인 에리트로포이에틴 용액 제형.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

상기 비이온 계면활성제는 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제나 폴록사머계 비이온 계면활성제 또는 이들의 혼합 형태의 계면활성제이고;

상기 다가 알코올은 프로필렌글리콜, 에틸렌글리콜, 저분자량 폴리에틸렌글리콜, 및 저분자량 폴리프로필렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이며;

상기 중성 아미노산은 글리신, 알라닌, 류신 및 이소류신으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이고;

상기 수용성 무기염은 염화나트륨, 염화칼슘 및 황산나트륨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이며;

상기 등장화제는 만니톨, 솔비톨, 시클리톨 및 이노시톨로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상이고;

상기 완충용액은 인산염 완충용액, 구연산 완충용액 및 트리스 완충용액으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 비이온 계면활성제는 폴리솔베이트 20이고, 상기 다가 알코올은 프로필렌글리콜이며, 상기 중성 아미노산은 글리신이고, 상기 수용성 무기염은 염화나트륨이며, 상기 등장화제는 만니톨이고, 상기 완충용액은 인산염 완충용액인 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 비이온 계면활성제는 0.0001 내지 0.01%(w/v)로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 다가 알코올은 0.0001 내지 0.1%(w/v)로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 중성 아미노산은 0.001 내지 2%(w/v)로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 수용성 무기염은 0.001 내지 0.7%(w/v)로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 등장화제는 0.1 내지 1.0%(w/v)로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 완충용액의 염 농도는 1 mM 내지 50 mM이고, pH는 6.0 내지 7.5인 것을 특징으로 하는 인 에리쓰로포이에틴 용액 제형.